应用于植物生理状态检测的低成本叶绿素荧光成像系统

杨振宇[1,2], 汤　浩[1,2], 葛　玮[1,2], 夏　倩[1,2], 仝德之[3], 付丽疆[1,2], 郭　亚[1,2*]

(1. 江南大学 轻工过程先进控制教育部重点实验室,江苏无锡 214122,中国; 2. 江南大学 物联网工程学院,江苏无锡 214026,中国; 3. 绿视芯科技(无锡)有限公司,江苏无锡 214000,中国)

摘　要：［**目的/意义**］植物光合作用过程中释放的叶绿素荧光与光化学反应紧密耦合，其荧光信号采集是光合作用效率、植物生理及环境胁迫等无损的测试手段。作为获取该信号的叶绿素荧光成像系统通常价格昂贵，针对此问题，本文提出一种低成本叶绿素荧光成像系统设计方案。［**方法**］叶绿素荧光成像系统主要由激发光灯组、CMOS（Complementary Metal Oxide Semiconductor）相机及其控制电路和智能手机上位机三部分组成。激光发灯组采用LED面光源和碗状结构，通过对光场的仿真分析保证光照强度和均匀性；采用微型CMOS相机进行荧光图像采集，利用智能手机作为上位机完成激发光控制，并将数据回传至手机或服务器进行分析、处理、存储及显示。［**结果和讨论**］基于该方案，制造了一款仪器样机，其激发光强最大为6250 μmol/（m^2·s），光场整体变化幅度偏差为2%，光谱范围为400～1000 nm，稳定的采集频率最高可达42 f/s，具备连续光激发和调制脉冲激发功能。［**结论**］通过叶绿素荧光图像采集实验验证了本仪器的有效性。该仪器结构简单、造价成本低，在植物生理状态检测领域有着很好的应用价值。

关键词：荧光检测；叶绿素荧光成像系统；光合作用；CMOS相机；TracePro

中图分类号：TP23;Q-334　**文献标志码：**A　**文章编号：**SA202306006

引用格式:杨振宇, 汤浩, 葛玮, 夏倩, 仝德之, 付丽疆, 郭亚. 应用于植物生理状态检测的低成本叶绿素荧光成像系统[J]. 智慧农业(中英文), 2023, 5(3): 154-165. DOI：10.12133/j.smartag.SA202306006

YANG Zhenyu, TANG Hao, GE Wei, XIA Qian, TONG Dezhi, FU Lijiang, GUO Ya. Low-cost chlorophyll fluorescence imaging system applied in plant physiology status detection[J]. Smart Agriculture, 2023, 5(3): 154-165. DOI：10.12133/j.smartag.SA202306006 (in Chinese with English abstract)

1　引　言

光合作用作为植物物质代谢和能量代谢的基础，直接影响农作物的生长。随着全球变暖和对粮食需求的加剧，针对光合作用的相关研究与测量愈加重要[1]。在光合作用的过程中，植物吸收太阳能，并将大部分吸收的光能转化成化学能，其余吸收的光能以热或者荧光形式释放。该荧光即叶绿素荧光，1931年由科学家Kautsky发现[2]。由于叶绿素荧光的释放过程与光化学反应密切相关，其可以用于感知光合作用、植物生理及环境胁迫。无论在宏观上研究叶片等植物组织，还是在微观上研究叶绿体等细胞器，叶绿素荧光检测法都起着非常重要的作用[3,4]，并且这种检测不会对植物造成损伤。因此，叶绿素荧光检测法被称为叶片光合功能的快速、无损检测探针[5]。

近年来，科研人员对于叶绿素荧光成像设备及分析系统进行了大量研究开发。WALZ公司和PSI

收稿日期：2023-06-07

基金项目：国家自然科学基金国际合作项目（51961125102）；国家自然科学基金面上项目（31771680）；江苏省农业科技自主创新资金项目（SCX（22）3669）

作者简介：杨振宇，研究方向为物联网、传感器仪器。E-mail：729141789@qq.com

*通信作者：郭　亚，博士，教授，研究方向为传感器仪器、光学检测、物联网、大数据分析。E-mail：guoya68@163.com

公司开发出诸如PAM-2500和FluorCam等叶绿素荧光采集设备，被广泛应用于叶绿素荧光检测领域[6-8]。徐赛龙[9]针对温室环境设计开发了一套可获取大面积叶绿素荧光的成像系统，但使用场景较为单一。Toda等[10]开发了一套结构紧凑、重量轻的多重成像系统用于温室番茄种植策略研究，该系统有助于改善复杂温室环境中的控制策略。上述研究均针对一些特定场景对荧光成像系统进行定制化改进，以获得该场景下更高的采集效率或更好的成像效果。此外，还可结合机器学习等新兴技术对荧光成像系统的结构与检测效率等方面进行改进。杨一璐[11]结合机器视觉技术和数字图像处理技术搭建了叶绿素荧光图像激发采集一体化系统，建立荧光参数检测模型，丰富了荧光仪的结果处理功能。李云[12]设计开发了一套便携式荧光图像探测系统，以树莓派为嵌入式系统平台，配合无损式叶夹可对单一叶片进行图像采集，提升了荧光成像系统的便携性。Legendre等[13]针对脉冲振幅调制（Pulse Amplitude Modulation，PAM）荧光测量系统复杂、昂贵的问题，开发了一套相对简单和低成本的荧光成像系统，根据荧光图像与传统的PAM荧光的对比分析验证了该成像系统的性能。

在实际应用中，除了精密的科研实验需求外，叶绿素荧光图像采集可以用于相关的快速定性分析及教学应用，但相关设备成本高、体积大、不便携，难以满足要求[14]。近年来，互补性氧化金属半导体（Complementary Metal-Oxide Semiconductor，CMOS）相机快速发展，使得图像采集仪器的体积变小，且成像质量逐步提高[15, 16]；同时智能手机目前无论在处理速度还是网络通信上都有了长足的进步，并且携带方便、操作简单，本身具备成为仪器控制设备和信息传输处理的特点[17, 18]，上述优势使得开发一款以CMOS相机和智能手机为基础的叶绿素荧光成像检测系统成为可能。因此，针对现有叶绿素荧光仪价格高昂的问题，本研究基于CMOS相机和智能手机研发一款低成本、便捷式的叶绿素荧光成像系统，对于植物生理状态检测领域有着很好的应用价值。

2　系统设计与分析

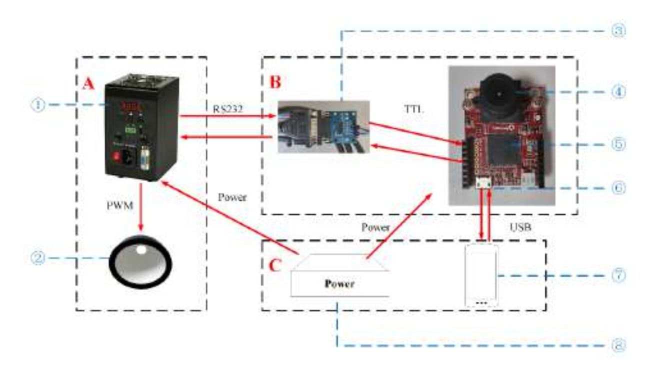
2.1 激发光及智能手机控制功能模块设计

叶绿素荧光仪的电路控制模块设计主要由两部分构成：相机的控制电路和激发光灯组的控制电路。相机的控制电路由微型CMOS相机、670 nm波段的高通滤光片、微控制单元（Microcontroller Unit，MCU）和TTL（Transistor-Transistor Logic，TTL）转RS232串口通信模块组成，各组件数量均为一个。滤光片可将460 nm的激发光滤除，保留670 nm以上的荧光。微控制单元MCU采用STM32单片机，480 MHz的处理器，32 MB的外置RAM（Random Access Memory，RAM），实现图像的采集和传输处理。在仪器进行采集工作时，MCU通过全速通用串行总线（Universal Serial Bus，USB）接口与智能手机互联，接收来自智能手机的参数设置以及具体的拍摄指令，根据相关参数和指令控制灯组产生相应的激发光及完成CMOS相机的拍摄工作，并将采集到的图像通过USB接口发送至智能手机。MCU与灯组控制电路的数据通信通过TTL串口实现，灯组的控制电路的数据接收为RS232串口协议，因此，此处增加1个TTL转RS232的串口通信模块进行数据通信。灯组的控制电路由LED（Light Emitting Diod）灯组和灯组控制器两个部分组成。LED灯组接收来自控制器的指令进行激发光产生，控制器则通过上述的串口与MCU进行数据通信，完成接收MCU对于灯组控制的相关指令，根据相关指令发送给LED灯组的高低电平信号实现对于LED灯组的控制。具体电路结构如图1所示。

硬件电路的控制程序主要完成接收手机的指令、控制灯组、完成荧光图像的采集和上传工作。手机软件的主要任务是完成用户的设定参数并将相关指令发送至控制电路，以及接收CMOS相机采集到的荧光图像信息，然后将其上传至服务器进行数据处理和分析，最后接收服务器的分析处理结果并将其可视化。

2.2 上位机软件设计

智能手机上位机软件是叶绿素荧光成像系统用户端的操作软件和荧光图像采集的总控制程序，在



注：A.灯组和其控制器电路；B.串口通信模块和CMOS相机及其控制电路；C.系统的独立电源以及智能手机外设；①为灯组控制器；②为激发光灯组；③为串口通信模块；④为CMOS相机；⑤为微控制单位MCU；⑥为USB接口；⑦为智能手机外设；⑧为独立电源

图1 叶绿素荧光成像系统的电路结构图

Fig. 1 Circuit structure diagram of the chlorophyll fluorescence imaging system

功能设计上需要完成以下几点：(1) 记录用户给定的激发光灯组和CMOS相机的参数设定，通过USB接口下发至电路控制程序；(2) 根据用户选定的叶绿素荧光激发方式下发拍摄指令并通过USB接收回传的荧光图像；(3) 通过网络进行荧光图像的上发并接收图像处理分析结果进行回显。

智能手机上位机软件具体的操作流程如图2所示，过程可简单描述为：首先上位机软件根据用户的操作生成响应的参数设置指令或相机拍摄指令；其次通过USB接口发送指令，若指令发送成功，开始监听USB接口是否有接收到回传的数据；若指令发送失败，则再次进行指令发送操作直至成功；最后根据接收到的数据完成相应的回显。

智能手机上位机软件的开发语言为Java，编程环境为Android Studio 2019，其中使用的JDK版本为JDK 1.8，Android SDK为API16 (Android 4.1以上适用)。程序开发按照Android程序编程步骤对程序进行编写调试，在程序完成模拟机调试转为真机调试时，需要开启智能手机的USB调试功能。因本程序需要完成USB接口和网络的通信功能，在软件运行时除了需要Android系统授予的常规权限外，还需申请系统USB和网络通信的权限。

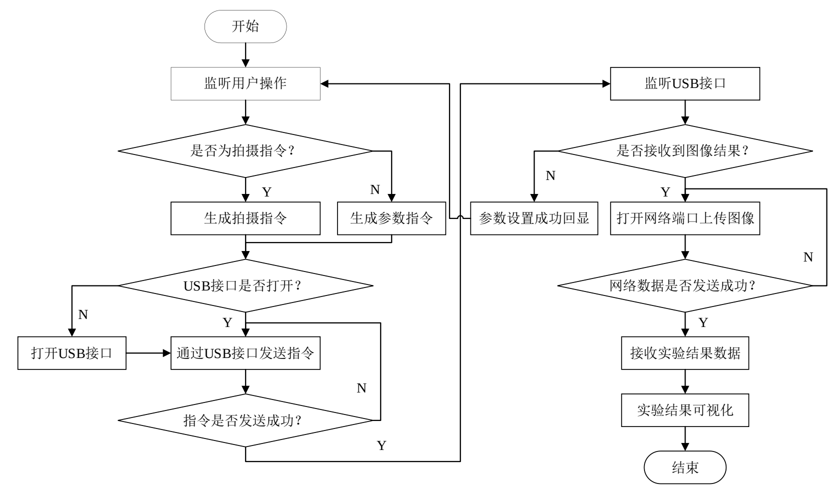


图2 叶绿素荧光成像系统的上位机软件流程图

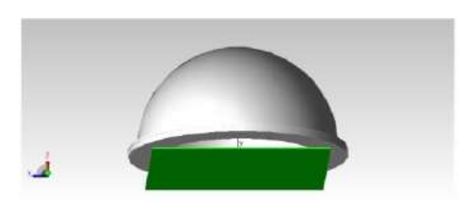
Fig. 2 Upper computer software flowchart of the chlorophyll fluorescence imaging system

2.3 灯组设计与分析

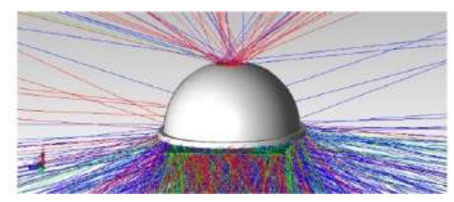
叶绿素可吸收多种波长的光，当使用420～470 nm波段的蓝光进行激发时，叶绿素分子处于最活跃的激发态，会产生很强的荧光，其中，叶绿素对于460 nm波段的光吸收效率高[19]，因此，本研究激发光源选择460 nm波段的蓝光光源[20]。考虑到本仪器非实验室使用场景的特点，LED光源相较于氙灯和汞灯具有功耗低、体积小、光强足等特点，故选择LED作为激发光源。本研究的设计同样适合红光激发，只需更换LED和滤波片即可。光源强度的控制采用脉冲宽度调制 (Pulse Width Modulation，PWM) 的调光方式，灯组输出的激发光强度根据在固定的时间周期内高低电平所占时间的比例决定。在灯组的结构设计上，借助积分球原理，采用碗状的光源结构，配合内壁的碗状漫射板，使光源发出的光线均匀照射，消除灯组本身发光不均

匀造成的干扰。为了保证灯组光照的均匀性及光通量符合叶绿素荧光检测的需要，采用TracePro进行光场仿真分析。

如图3（a）所示，灯组模型下方的绿色平面即为模拟的光照面，其中心与灯组的中心同轴。图3（b）为灯组开启后，对LED面光源发出的光线进行轨迹追踪。



(a)光照入射面示意图



(b)光线轨迹追踪图

图3 激发光灯组的光照入射面示意图和光线轨迹追踪图

Fig. 3 Schematic diagram of light incident surface and ray tracing diagram of the excitation light group

在激发光的强度计算上，采用光量子通量密度（Photosynthetic Photon Flux Density， PPFD）进行计量，并参考文献资料和相关仪器的实际标定[21]。本仪器拟设定测量光的光量子通量密度最大值要满足饱和光强的要求，饱和光脉冲则大于5000 μmol/(m²·s)；光化光的强度小于饱和光强度，具有很宽的范围（1000～3000 μmol/(m²·s)）[22]，容易通过PWM调节满足；所采集的调制测量光小脉冲应数值适中且有较好的信噪比，同时不能过于大，以防影响叶片光合系统的闭合状态，考虑光场理论计算与实际系统较小的偏差可能对小脉冲效果影响较大，因此本研究通过实验确定小脉冲的光强值。对于饱和光与光化光，具体光量子通量密度的计算方法为公式（1）。

$$I_s = \frac{\alpha \times N \times P \times \sigma_{460}}{K_{460} \times E_{460} \times S} \tag{1}$$

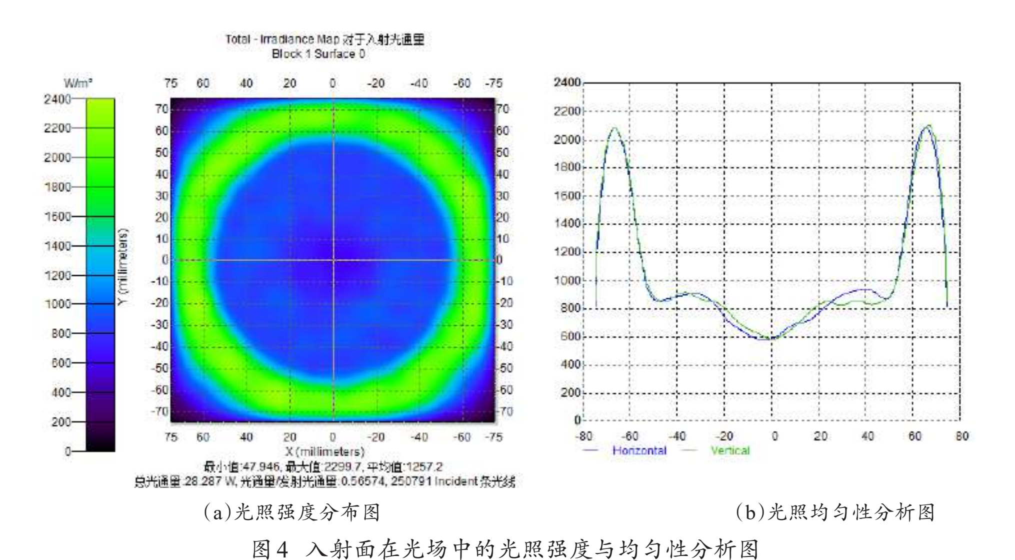
其中，I_s为光量子通量密度，μmol/(m²·s)；α为LED光源的实际发光效率（约为45.3%）；N为LED光源的个数。本研究中，LED采用面光源，故$N = 1$；P为LED光源的发光功率，W；σ_{460}为460 nm波长LED灯的光能转换效率，本研究采用的光源对应的效率为100 lm/W；K_{460}为波长为460 nm的光子1 W辐射能通量相当的流明数，约为40.98 lm；E_{460}为460 nm波长的光子的能量，约为0.2620；S为探测区域的面积，m²[23, 24]。

依据图3的光场模拟，将LED光源开启至最大功率12 W，在TracePro中，对上述入射面进行光通量的分析可得到图4的光照强度分布。其中，图4（a）为入射面整体的光通量分布图，图4（b）为分布图中两条中心线所在剖面光强分布图。从图4中可以看出，入射面的中心为一个圆形区域，整体的光通量相对均匀，最小值为727 W/m²，最大值为871 W/m²，均值为811 W/m²，最大幅度偏差在20%以下，平均幅度变化偏差为14%，呈现中心对称分布，因此可将该圆形区域视为本仪器的有效采集区域。在入射面的中心位置，光强偏低，这是由于在顶端预留的相机采集口会导致光线逃逸所致。为进一步提高激发光在测量平面上的光场均匀性，可以使用两条中心线的光强沿着半径方向分布进行归一化来补偿该系统误差。图5为补偿后的光强分布图，最小值为856 W/m²，最大值为890 W/m²，均值为872 W/m²，最大幅度偏差降至5%以下，平均偏差约为2%。光场的均匀性获得了显著的提高。

入射面中心有效区域的面积为90 mm×90 mm，将上述区域内的最小光通量值代入公式（1）可得到I_s为6250 μmol/(m²·s)，满足饱和脉冲的要求。将灯组的光照强度控制平均分为255个档位，在180档位时，光通量强度下降至光化光强度；对于本研究加工的系统，经过实验验证，当档位设为10时，能够获得较好的荧光脉冲，同时荧光脉冲没有明显增加，因此本研究将调制小脉冲强调档位设为10。在实际的具体开发中，该档位值可以根据具体的器件实验确定。

2.4 微型CMOS荧光成像强度分析

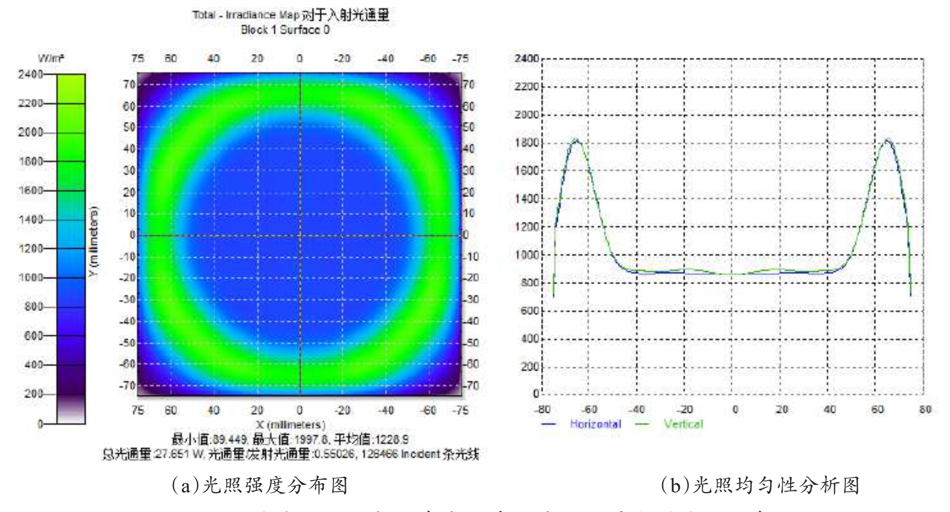
本研究以OmniVision公司所生产的OV5640 CMOS相机为例作为图像采集传感器进行分析，其他型号的相机可以参照进行分析。OV5640CMOS相机关键技术参数如下：分辨率像素为2592×1944；CMOS尺寸为47.5 mm×35 mm，灵敏度为



(a)光照强度分布图 (b)光照均匀性分析图

图4 入射面在光场中的光照强度与均匀性分析图

Fig. 4 Illumination intensity and uniformity analysis diagram of the incident surface in the light field



(a)光照强度分布图 (b)光照均匀性分析图

图5 加入补偿后的入射面在光场中的光照强度与均匀性分析图

Fig. 5 Illumination intensity and uniformity analysis diagram of the incident surface in the light field after compensation

600 mV/lux·s，光谱响应范围为400～1000 nm，量子效率*QE*（Quantum Efficiency）为60.59%，暗噪声*DN*［*e*］（Dark Noise）为2.68，*AST*［*γ*］（Absolute Sensitivity Threshold）为5.38，最高频率可达90 f/s。

根据灯组光场的仿真分析，为保证仪器信号有效，CMOS相机需要满足在光化光的条件下完成荧光图像的采集。叶片光吸收系数（Absorptance）*Abs.* ≈ 80%，其中产生荧光能量占所吸收光能的比例$\sigma \approx 3\%$，为有效采集荧光需要在CMOS相机前加装一个滤光片，其透光率$T \approx 95\%$，实际CMOS传感器捕捉到的荧光光子数量还与传感器尺寸有关，其尺寸面积占总面积的比例$\tau \approx 5\%$。综上所述，可得出在光化光条件下CMOS相机采集到有效的因荧光产生的电荷，如公式（2）所示。

$$Q_e = I_s \times s \times t \times Abs. \times \sigma \times T \times \tau \times QE \quad (2)$$

其中，*s*为叶片有效面积，m²；*t*为采集时长，s；*QE*为电子转化率。上述采集到的电荷数量能否满足图像采集需要，还需将其与暗噪声*DN*相比较，即需要Q_e大于*DN*的值。将各数据代入公式（3）中可知，在光化光条件下，CMOS相机采集到的信息所产生电子数量Q_e约为10.62，大于*DN*的电荷幅值2.68，故可认定CMOS相机可有效采集光化光条件下的荧光信息，即将公式（1）代入可得到验证公式（3）。

$$\frac{\alpha \times N \times P \times \sigma_{460} \times s \times t \times Abs. \times \sigma \times \mathrm{T} \times \tau \times QE}{K_{460} \times E_{460} \times S} > DN \quad (3)$$

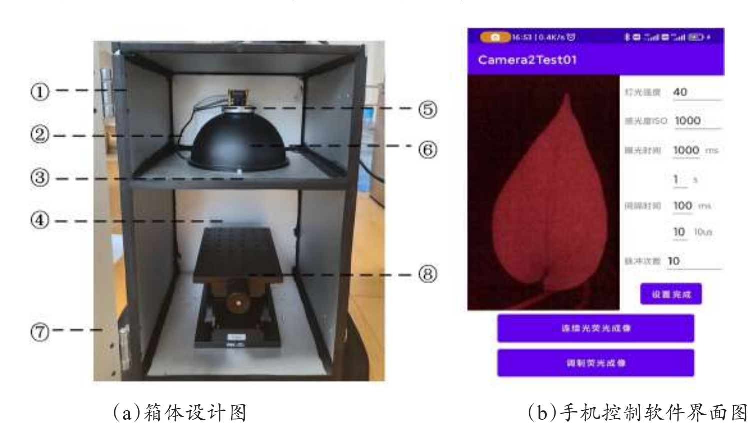
又因光化光条件下为叶片的最小荧光，因此其他激发光条件下CMOS相机均可采集到叶绿素荧光图像，因此CMOS相机能够满足采集需求，为仪器开发的小型化、便携化及低成本奠定基础。

3 结果与分析

3.1 纸张接受光照均匀度验证

为了验证本研究提出的分析方案设计效果，自制了一套基于该方案的叶绿素荧光成像系统样机，进行实验验证。该样品箱体机械结构和智能手机控制软件界面如图6所示。

为验证激发光灯组实际的光场均匀度是否符合上文仿真结果，在荧光仪中放入一张平整的白色打印纸调整至上文光照面位置，按照顺时针方向每次旋转90°，各角度各拍摄一次。按照上文仿真中的方法，在分布图取两条中心线处的光通量进行结果分析，各角度下的光通量数据如图7所示。



(a)箱体设计图　(b)手机控制软件界面图

注：①为叶绿素荧光仪的箱体结构；②为内部组件放置仓；③为隔断板；④为植物放置仓；⑤为相机固定板；⑥为灯组和灯罩装置；⑦为门板，因视图需要此处对门板进行了隐藏处理；⑧为升降台

图6　叶绿素荧光成像系统的箱体结构设计和智能手机软件界面图

Fig. 6 The structural design of the fluorimeter cabinet and the interface diagram of the smart phone software

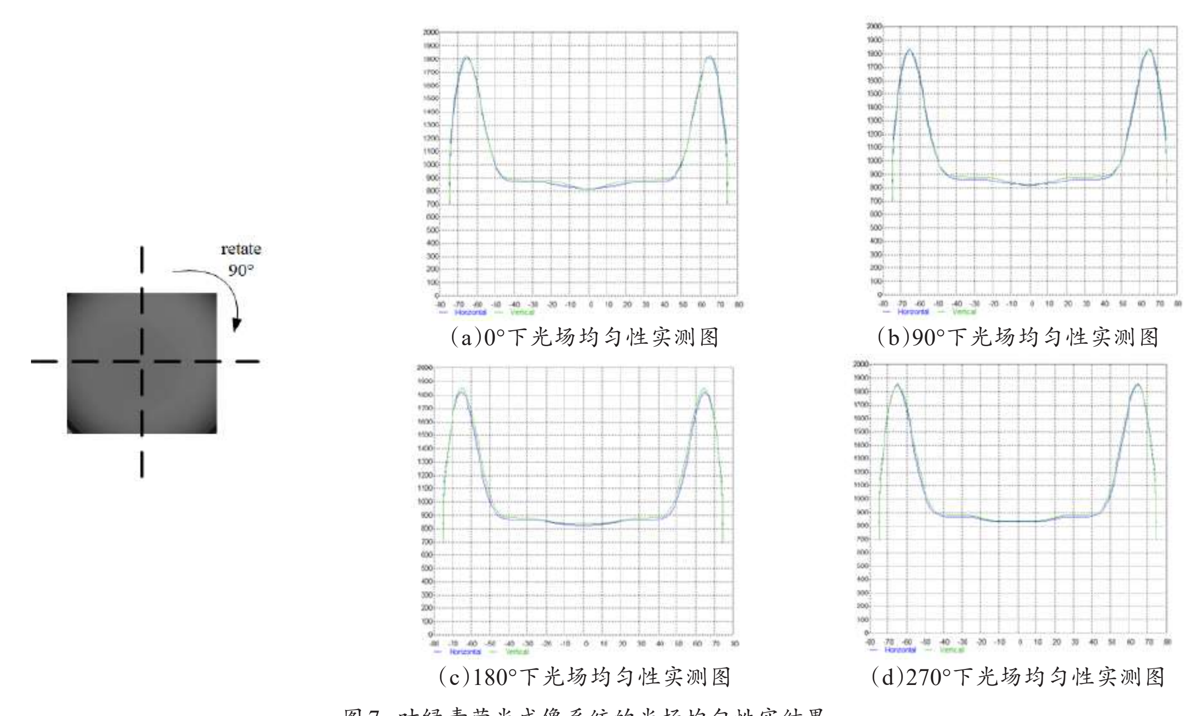


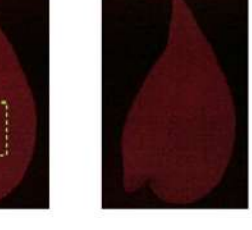
图7　叶绿素荧光成像系统的光场均匀性实结果

Fig. 7 Measured results of light field uniformity of the chlorophyll fluorescence imaging system

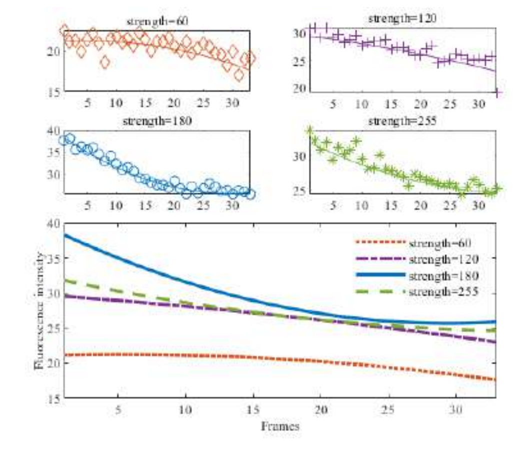
四个角度下光通量最大值、最小值和平均值分别在867、817和846 W/m² 上下浮动，均小于仿真值30 W/m² 左右，最大变化幅度整体在6%左右，平均变化幅度约为2.3%，与仿真的光强分布一致。由于LED灯组的实际功率与额定功率存在一定误差，灯组的反射面实际反射吸收存在一定偏差，导致整体光通量略小于仿真值，平均变化幅度略大于仿真结果，但光通量仍可以满足测量需要，属于正常误差，无需再进行矫正，故实际的激发光灯组性能能够满足仪器要求。

3.2 连续光下的叶绿素荧光成像测试

在叶片完成30 min暗适应后，打开灯光给予叶片光照，相机每隔30 ms获取一张叶片的荧光图像，记录叶片在连续光的前期快速响应过程，在1 min后，相机改为每隔30 s获取一张叶片的荧光图像，记录叶片在连续光照射下后期缓慢地适应过程，实验结果如图8所示。图8（a）～图8（c）分别为灯光强度Strength为180档位时连续光照射下所测得的第5、15和25帧荧光图像。图8（d）为连续光测量下灯光强度Strength为60、120、180和255档位对应的叶片荧光强度变化图以及荧光强度随时间变化趋势的拟合结果对比图，其中叶片的荧光强度由图8（a）中所示目标区域（Region of Interest，ROI）内的平均荧光强度表示。




(a)光强180档位下第5帧荧光图像 (b)光强180档位下第15帧荧光图像 (c)光强180档位下第25帧荧光图像



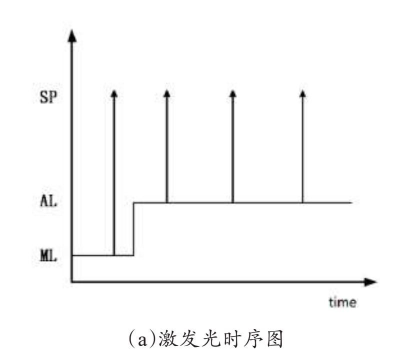
(d)光强于60、120、180、255档位下叶片ROI区域的平均荧光强度变化图和拟合曲线图

图8 连续光下的荧光图像特征图

Fig. 8 Typical fluorescence images under continuous light

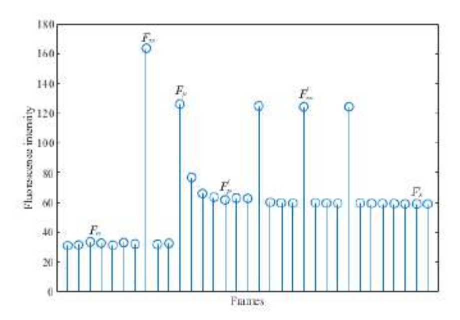
3.3 调制叶绿素荧光及特征参数

调制叶绿素荧光主要包含如下特征值：荧光最小值F_o，饱和光荧光最大值F_m，光化光荧光最大值F_p，光化光下饱和脉冲荧光最大值F'_m，稳态叶绿素荧光值F_s。验证本仪器能否完成有效的调制荧光的采集，主要取决于上述荧光特征值是否得到有效的采集。具体的激发光时序图和采集到的调制叶绿素荧光强度如图9所示。



(a)激发光时序图

注：ML为测量光；AL为光化光；SP为饱和光脉冲



(b)根据时序图采集到的调制叶绿素荧光强度图

图9 获取调制荧光的激发光时序图和调制荧光强度图

Fig. 9 Excitation light timing diagram and modulated fluorescence intensity diagram

图中9（a）为调制荧光测量过程中的激发光时序图，主要分为测量光（Measuring Light，ML），光化光（Actinic Light，AL），饱和光脉冲（Saturation Pulse，SP）。测量过程可描述如下：植物在经

过暗适应后，给予测量光激发可测得F_o；然后将激发光改为饱和脉冲，此时光合作用受到抑制，可测得F_m；随着饱和脉冲的结束，荧光值迅速回落至F_o，此时打开光化光可测得F_p；随着光合作用达到一个平衡状态，荧光值也趋于稳定，可测得F_s；此后每隔一段时间给予一个饱和脉冲，植物光合作用受到抑制，荧光值上升至F'_m。图9（b）为此顺序下仪器采集到的荧光强度图，具体每帧的荧光强度如图8（a）所示。在叶片中选定一个ROI，计算ROI内的荧光强度平均值。从图8（b）中可以看出，根据此测量方案可以提取到荧光特征值F_o、F_m、F_p、F'_m和F_s。因此，本仪器具备采集调制叶绿素荧光功能以及提取其中荧光特征值的能力。

根据上文中获得的叶绿素荧光特征值可以进行相关的特征参数分析，其中参数F_v/F_m和*Rfd*有着广泛的应用。F_v/F_m代表PS II的最大量子效率，反映植物潜在的最大光合能力。当植物受到胁迫时，参数F_v/F_m将会显著下降。常规的高等植物该特征参数值一般在0.8上下浮动[25]，其与荧光特征值的关系可表示为公式（4）。

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m \tag{4}$$

*Rfd*是评估植物光合作用能力的参数。植物的生理状态越好，光合作用能力越强，*Rfd*的值也会越大[26]，与荧光特征值之间满足公式（5）的关系。

$$Rfd = (F_p - F_s)/F_s \tag{5}$$

稳态叶绿素荧光F_s的幅值受到光强度和其他环境条件影响下光化学和非光化学过程动态调节的影响。目前基于F_s测量的遥感技术，即日光诱导叶绿素荧光（Solar-induced Chlorophyll Fluorescence，SIF）在评估生态系统碳循环[27,28]、植被物候监测[29,30]以及环境胁迫研究[31-32]中受到广泛关注。

调制脉冲叶绿素荧光成像采集结果如图10所示。F_o的荧光强度整体处在30～50的区间，F_m的荧光强度处于160～180的区间，特征参数F_v/F_m整体均处于0.8上下，符合上文中提及的常规值。对于特征参数*Rfd*，具体的实验结果如图11所示。F_p的荧光强度整体介于120～160，F_s的荧光强度大致介于50～80，比值参数*Rfd*约为1～1.6，与参考文献［26］相符。

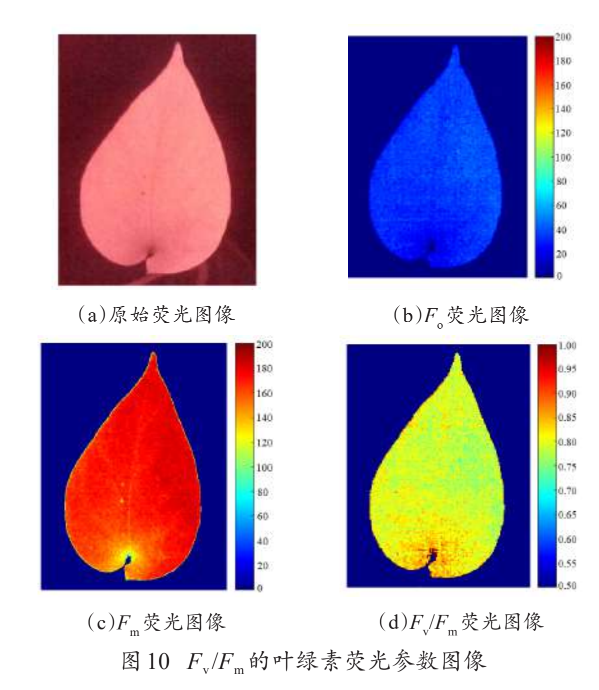


图10 F_v/F_m的叶绿素荧光参数图像

Fig. 10 Chlorophyll fluorescence parameter image F_v/F_m

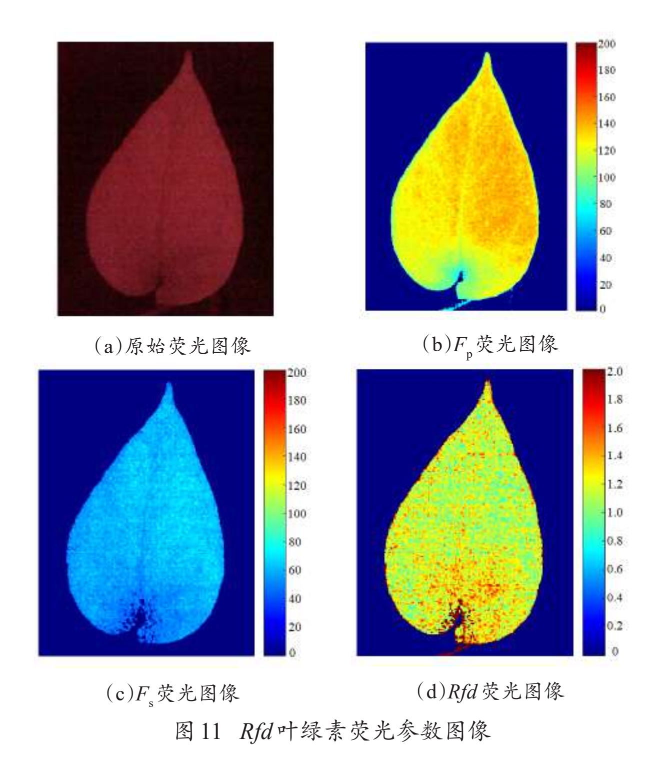


图11 *Rfd*叶绿素荧光参数图像

Fig. 11 Chlorophyll fluorescence parameter image *Rfd*

3.4 系统参数指标

该叶绿素荧光成像系统的部分核心参数指标如表1所示，主要包括激发光灯组和CMOS相机采集模组的相关参数、荧光仪尺寸及荧光激发模式等参数。

除上述参数指标外，本研究所设计的叶绿素荧

表1 叶绿素荧光成像系统部分参数表

Table 1 Partial parameters of the chlorophyll fluorescence system

参数指标	参数
激发光源	460 nm 蓝光LED碗状面光源
光场强度	最高约为5965 μmol/(m²·s)
光场均匀度	偏差约为2%
有效区域	90 mm×90 mm
成像像素	最高500 W
光谱响应范围	400～1000 nm
采集帧率	最高稳定频率为42 f/s
整体尺寸	32 cm×32 cm×50 cm
实际容纳尺寸	30 cm×30 cm×25 cm
荧光激发模式	连续激发式或调制激发式

光成像系统与现有的主流叶绿素荧光仪的部分参数对比如表2所示。本叶绿素荧光成像系统相较于传统的单点荧光检测，可采集到叶片整体的荧光信息，可直观地展现叶绿素荧光的二维异质性。与现有的叶绿素荧光成像系统相比，图像采集单元使用CMOS相机替代电荷耦合器件图像传感器CCD（Charge Coupled Device），同时充分利用智能手机这一普及度高、软硬件性能出色的电子设备作为控制、处理和显示的终端，最大程度地简化构造，大幅降低荧光仪的成本。并且得益于构造的简化，本叶绿素荧光成像系统相比于其他荧光仪尺寸适中、结构简单，结合智能手机与服务器可实现对荧光图像的远程分析与处理，对使用环境要求较低，可满足户外等多场景下对叶绿素荧光检测需要。客观来说，受限于开发时间、荧光采集方式及硬件条件，本叶绿素荧光成像系统相比于其他荧光仪，实现的功能相对较少，采集精度相对较低，但足以满足荧光诱导过程和荧光参数的快速检测工作。

表2 各主流叶绿素荧光仪参数对比表

Table 2 Parameter comparison table of mainstream chlorophyll fluorescence meters

型号	采集方式	功能	使用场景	价格
M-PEA-2	单点荧光	OJIP分析、快速荧光参数等	实验室	约40万元
FluorPen 100	单点荧光	OJIP分析、快速荧光参数等	多场景	约3万元
PAM-2500	单点荧光	OJIP分析、光响应曲线等	多场景	约20万元
FluorCam 800	荧光成像	荧光诱导过程和淬灭过程分析等	实验室	约20万元
本荧光仪	荧光成像	荧光诱导过程及荧光参数测量	多场景	1万元以下

3.5 讨论

本研究通过COMS相机与智能手机的配合，提出了低成本叶绿素荧光成像系统的实现方案，通过光线仿真分析与校正，保证了激发光强强度与均匀性，通过信号的强度分析与相机的噪声对比，保证了信号的有效性。通过自制叶绿素荧光仪雏形设备验证了该设计的可行性。实验结果表明，该叶绿素荧光成像系统能够采集连续光激发下的叶绿素荧光成像，也能够实现调制脉冲下的叶绿素荧光成像。

从图8中可看出，在4个灯光强度连续光的激发下，叶片的荧光强度均随时间的推移呈现下降趋势并且趋势逐渐放缓，最终荧光强度趋于一个稳定值，符合光保护机制及叶绿素荧光动力学效应[34]。由于在连续光的情况下受限于相机的最快采集速度，当光强很大时，无法采集到叶绿素荧光强度随时间增加的过程，因此当光照强度为60时，能够看到短暂的叶绿素荧光强度上升及保持的过程后再下降；但当光照强度为180时，只能看到叶绿素荧光图像强度下降的过程，符合预期。

对于F_v/F_m及*Rfd*这两者荧光特征值而言，叶片在各区域上的差异较为明显。叶片的中心区域的荧光强度相比于边缘以及靠近叶柄的区域更强，表明叶片中叶绿素含量及活性不均匀的特点。这一特点在特征参数*Rfd*的图11中也可以较为明显地看出。叶片的光合能力在不同区域存在较为明显的差异，但整体基本统一，波动较小。

虽然连续光激发下F_o在本研究提出的系统上难以测定，但是其F_o成像在调制脉冲饱和协议上能够实现。因此，本研究设计的叶绿素荧光成像系统能够降低成本，可作为叶绿素荧光图像的快速定性分析工具，同时能够满足低成本的叶绿素荧光教学仪器实现的需要。

4 结论与展望

为解决叶绿素荧光成像系统价格昂贵的问题，

本研究基于CMOS相机和智能手机实现了叶绿素荧光成像系统的低成本设计。通过光学仿真及PWM光强控制，保证激发光强的均匀性与强度要求，可满足最小叶绿素荧光光强的有效获取。实验表明，该方案能够获取连续光激发下的叶绿素荧光图像采集及调制脉冲光协议下的叶绿素荧光采集，所获取的叶绿素荧光图像能够有效区分具有差异的不同样品光合特征，典型的叶绿素荧光参数图像 F_v/F_m 和 *Rfd* 等符合预期。本研究成果有利于叶绿素荧光仪的低成本实现及应用。

本文虽然初步完成了叶绿素荧光成像设备的低成本实现，并完成了相关的实验测试与应用，但是从整体的设计实现及实验方案的来说，仍存如下有待改进地方：（1）在系统软件的功能设计上，目前荧光仪实现了荧光图像的实时显示和初步处理，但只能对单次实验结果进行分析显示，缺少不同实验结果之间的比较，在后续研究开发中可加入多次采集结果的对比分析功能；（2）目前使用该荧光仪进行的实验中，用于植物生理分析的荧光特征参数较少，可增加其他荧光特征参数的分析与应用；（3）可加入植物胁迫检测实验，探究生理胁迫对叶绿素荧光成像的影响，进一步发挥该荧光仪的应用价值。

利益冲突声明：本研究不存在研究者以及与公开研究成果有关的利益冲突。

参考文献：

[1] SCHMIDT-LEBUHN A N, MARSHALL D J, DREIS B, et al. Genetic rescue in a plant polyploid complex: Case study on the importance of genetic and trait data for conservation management[J]. Ecology and evolution, 2018, 8 (10): 5153-5163.

[2] STIRBET A. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient[J]. Journal of photochemistry and photobiology B: biology, 2011, 104(1/2): 236-257.

[3] GUO Y, TAN J L. Recent advances in the application of chlorophyll a fluorescence from photosystem II[J]. Photochemistry and photobiology, 2015, 91(1): 1-14.

[4] ALEMU S T. Photosynthesis limiting stresses under climate change scenarios and role of chlorophyll fluorescence: A review article[J]. Cogent food & agriculture, 2020, 6(1): ID 1785136.

[5] ZHANG C, ZHOU L, XIAO Q L, et al. End-to-end fusion of hyperspectral and chlorophyll fluorescence imaging to identify rice stresses[J]. Plant phenomics, 2022, 2022: ID 9851096.

[6] DONG Z F, MEN Y H, LIU Z Z, et al. Application of chlorophyll fluorescence imaging technique in analysis and detection of chilling injury of tomato seedlings[J]. Computers and electronics in agriculture, 2020, 168: ID 105109.

[7] PÉREZ-BUENO M L, PINEDA M, BARÓN M. Phenotyping plant responses to biotic stress by chlorophyll fluorescence imaging[J]. Frontiers in plant science, 2019, 10: ID 1135.

[8] ZHANG H C, GE Y F, XIE X Y, et al. High throughput analysis of leaf chlorophyll content in sorghum using RGB, hyperspectral, and fluorescence imaging and sensor fusion[J]. Plant methods, 2022, 18(1): ID 60.

[9] 徐赛龙. 基于叶绿素荧光图像的温室作物监测系统开发[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
XU S L. Development of monitoring system of greenhouse crops based on chlorophyll fluorescence images[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.

[10] TODA S, TAKAYAMA K, KANOH T, et al. Development of multiple biological information imaging system for tomato plants cultivated in greenhouse[J]. Ecological engineering, 2020, 32(2): 33-37.

[11] 杨一璐. 基于叶绿素荧光的作物信息快速获取与检测方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
YANG Y L. Research on fast acqisition and detection of crop information based on the chlorophyll fluorescence[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.

[12] 李云. 叶绿素荧光便携式探测系统的设计与实现[D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
LI Y. The design and implementation of portable detection system for chlorophyll fluorescence[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2020.

[13] LEGENDRE R, BASINGER N T, VAN IERSEL M W. Low-cost chlorophyll fluorescence imaging for stress detection[J]. Sensors, 2021, 21(6): ID 2055.

[14] GOSSET A, DURRIEU C, RENAUD L, et al. Xurography-based microfluidic algal biosensor and dedicated portable measurement station for online monitoring of urban polluted samples[J]. Biosensors and bioelectronics, 2018, 117: 669-677.

[15] WANG J, SMITH R J, LIGHT R A, et al. Highly sensitive multipoint real-time kinetic detection of surface plasmon bioanalytes with custom CMOS cameras[J]. Biosensors and bioelectronics, 2014, 58: 157-164.

[16] NGUYEN V D, NGUYEN H Q, BUI K H, et al. A handheld-type total integrated capillary electrophoresis system for SARS-CoV-2 diagnostics: Power, fluorescence detection, and data analysis by smartphone[J]. Biosensors & bioelectronics, 2022, 195: ID 113632.

[17] JIAN D, WANG B, HUANG H C, et al. Sunlight based handheld smartphone spectrometer[J]. Biosensors & bioelectronics, 2019, 143: ID 111632.

[18] LI J H, WU X P, LI Y, et al. Amplification-free smart-

phone-based attomolar HBV detection[J]. Biosensors and bioelectronics, 2021, 194: ID 113622.
[19] PFÜNDEL E E. Simultaneously measuring pulse-amplitude-modulated (PAM) chlorophyll fluorescence of leaves at wavelengths shorter and longer than 700 nm[J]. Photosynthesis research, 2021, 147(3): 345-358.
[20] BAIDYA A, AKTER T, ISLAM M R, et al. Effect of different wavelengths of LED light on the growth, chlorophyll, β-carotene content and proximate composition of *Chlorella ellipsoidea*[J]. Heliyon, 2021, 7(12): ID e08525.
[21] AJIGBOYE O O, RAY R V, MURCHIE E H. Chlorophyll fluorescence on the fast timescale[J]. Methods in molecular biology, 2018, 1770: 95-104.
[22] JUNKER L V, ENSMINGER I. Relationship between leaf optical properties, chlorophyll fluorescence and pigment changes in senescing *Acer saccharum* leaves[J]. Tree physiology, 2016, 36(6): 694-711.
[23] GREEN M A, BREMNER S P. Energy conversion approaches and materials for high-efficiency photovoltaics[J]. Nature materials, 2016, 16(1): 23-34.
[24] BORELLA L, SFORZA E, BERTUCCO A. An internally LED illuminated photobioreactor to increase energy conversion efficiency: Design and operation[J]. Energy conversion and management, 2022, 270: ID 116224.
[25] ROUSSEAU C, BELIN E, BOVE E, et al. High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis[J]. Plant methods, 2013, 9(1): ID 17.
[26] LICHTENTHALER H K, LANGSDORF G, LENK S, et al. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity with the flash-lamp fluorescence imaging system[J]. Photosynthetica, 2005, 43(3): 355-369.
[27] COLOMBO R, CELESTI M, BIANCHI R M, et al. Variability of sun-induced chlorophyll fluorescence according to stand age-related processes in a managed loblolly pine forest[J]. Global change biology, 2018, 24(7): 2980-2996.
[28] DAMM A, GUANTER L, PAUL-LIMOGES E, et al. Far-red sun-induced chlorophyll fluorescence shows ecosystem-specific relationships to gross primary production: An assessment based on observational and modeling approaches[J]. Remote sensing of environment, 2015, 166: 91-105.
[29] DAUMARD F, GOULAS Y, CHAMPAGNE S, et al. Continuous monitoring of canopy level sun-induced chlorophyll fluorescence during the growth of a *Sorghum* field[J]. IEEE transactions on geoscience and remote sensing, 2012, 50(11): 4292-4300.
[30] MIAO G F, GUAN K Y, YANG X, et al. Sun-induced chlorophyll fluorescence, photosynthesis, and light use efficiency of a soybean field from seasonally continuous measurements[J]. Journal of geophysical research: Biogeosciences, 2018, 123(2): 610-623.
[31] SANDERS A, VERSTRAETEN W, KOOREMAN M, et al. Spaceborne sun-induced vegetation fluorescence time series from 2007 to 2015 evaluated with Australian flux tower measurements[J]. Remote sensing, 2016, 8(11): ID 895.
[32] WIENEKE S, BURKART A, CENDRERO-MATEO M P, et al. Linking photosynthesis and sun-induced fluorescence at sub-daily to seasonal scales[J]. Remote sensing of environment, 2018, 219: 247-258.
[33] KALAJI H M, SCHANSKER G, BRESTIC M, et al. Frequently asked questions about chlorophyll fluorescence, the sequel[J]. Photosynthesis research, 2017, 132(1): 13-66.

Low-Cost Chlorophyll Fluorescence Imaging System Applied in Plant Physiology Status Detection

YANG Zhenyu[1,2], TANG Hao[1,2], GE Wei[1,2], XIA Qian[1,2], TONG Dezhi[3], FU Lijiang[1,2], GUO Ya[1,2*]

(1. *Key Laboratory of Advanced Process Control for Light Industry, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi* 214122, *China*; 2. *School of Internet of Things, Jiangnan University, Wuxi* 214122, *China*; 3. *Chloview Science and Technology (Wuxi) Co. Ltd, Wuxi* 214000, *China*)

Abstract:
[Objective] Chlorophyll fluorescence (ChlF) emission from photosystem II (PSII) is closely coupled with photochemical reactions. As an efficient and non-destructive means of obtaining plant photosynthesis efficiency and physiological state information, the collection of fluorescence signals is often used in many fields such as plant physiological research, smart agricultural information sensing, etc. Chlorophyll fluorescence imaging systems, which is the experimental device for collecting the fluorescence signal, have difficulties in application due to their high price and complex structure. In order to solve the issues, this paper investigates and constructs a low-cost chlorophyll fluorescence imaging system based on a micro complementary metal oxide semiconductor (CMOS) camera and a smartphone, and carries out experimental verifications and applications on it.
[Method] The chlorophyll fluorescence imaging system is mainly composed of three parts: excitation light, CMOS camera and its

control circuit, and a upper computer based on a smartphone. The light source of the excitation light group is based on the principle and characteristics of chlorophyll fluorescence, and uses a blue light source of 460 nm band to achieve the best fluorescence excitation effect. In terms of structure, the principle of integrating sphere was borrowed, the bowl-shaped light source structure was adopted, and the design of the LED surface light source was used to meet the requirements of chlorophyll fluorescence signal measurement for the uniformity of the excitation light field. For the adjustment of light source intensity, the control scheme of pulse width modulation was adopted, which could realize sequential control of different intensities of excitation light. Through the simulation analysis of the light field, the light intensity and distribution characteristics of the light field were stuidied, and the calibration of the excitation light group was completed according to the simulation results. The OV5640 micro CMOS camera was used to collect fluorescence images. Combined with the imaging principle of the CMOS camera, the fluorescence imaging intensity of the CMOS camera was calculated, and its ability to collect chlorophyll fluorescence was analyzed and discussed. The control circuit of the CMOS camera uses an STM32 microcontroller as the microcontroller unit, and completes the data communication between the synchronous light group control circuit and the smartphone through the RS232 to TTL serial communication module and the full-speed universal serial bus, respectively. The smartphone upper computer software is the operating software of the chlorophyll fluorescence imaging system user terminal and the overall control program for fluorescence image acquisition. The overall workflow could be summarized as the user sets the relevant excitation light parameters and camera shooting instructions in the upper computer as needed, sends the instructions to the control circuit through the universal serial bus and serial port, and completes the control of excitation light and CMOS camera image acquisition. After the chlorophyll fluorescence image collection was completed, the data would be sent back to the smart phone or server for analysis, processing, storage, and display. In order to verify the design of the proposed scheme, a prototype of the chlorophyll fluorescence imaging system based on this scheme was made for experimental verification. Firstly, the uniformity of the light field was measured on the excitation light to test the actual performance of the excitation light designed in this article. On this basis, a chlorophyll fluorescence imaging experiment under continuous light excitation and modulated pulse light protocols was completed. Through the analysis and processing of the experimental results and comparison with mainstream chlorophyll fluorometers, the fluorescence imaging capabilities and low-cost advantages of this chlorophyll fluorometer were further verified.

[Results and Discussions] The maximum excitation light intensity of the chlorophyll fluorescence imaging system designed in this article was 6250 μmol/(m^2·s). Through the simulation analysis of the light field and the calculation and analysis of the fluorescence imaging intensity of the CMOS camera, the feasibility of collecting chlorophyll fluorescence images by the OV5640 micro CMOS camera was demonstrated, which provided a basis for the specific design and implementation of the fluorometer. In terms of hardware circuits, it made full use of the software and hardware advantages of smartphones, and only consisted of the control circuits of the excitation light and CMOS camera and the corresponding communication modules to complete the fluorescence image collection work, simplifying the circuit structure and reducing hardware costs to the greatest extent. The final fluorescence instrument achieved a collection resolution of 5 million pixels, a spectral range of 400~1000 nm, and a stable acquisition frequency of up to 42 f/s. Experimental results showed that the measured data was consistent with theoretical analysis and simulation, which could meet the requirements of fluorescence detection. The instrument was capable of collecting images of chlorophyll fluorescence under continuous light excitation or the protocol of modulated pulsed light. The acquired chlorophyll fluorescence images could reflect the two-dimensional heterogeneity of leaves and could effectively distinguish the photosynthetic characteristics of different leaves. Typical chlorophyll fluorescence parameter images of F_v/F_m, Rfd, etc. were in line with expectations. Compared with the existing chlorophyll fluorescence imaging system, the chlorophyll fluorescence imaging system designed in this article has obvious cost advantages while realizing the rapid detection function of chlorophyll fluorescence.

[Conclusions] The instrument is with a simple structure and low cost, and has good application value for the detection of plant physiology and environmental changes. The system is useful for developing other fluorescence instruments.

Key words: chlorophyll fluorescence detection; chlorophyll fluorescence imager; photosynthesis; CMOS camera; TracePro

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (51961125102, 31771680); Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovataion Fund (SCX(22)3669)